



EPO3/50350

PCT/EP 03 / 5 0 3 5 0 #2

Rec'd PCT/PTO

31 JAN 2005
PL 08 2003

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
CONFÉDÉRATION SUISSE
CONFEDERAZIONE SVIZZERA

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein überein. Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein spécifiée à la page suivante. La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

Attestazione

I documenti allegati sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein specificata nella pagina seguente. La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

Bern, 24. JULI 2003

REC'D 19 SEP 2009

WIPO

PCT

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle
Istituto Federale della Proprietà Intellettuale

Patentverfahren
Administration des brevets
Amministrazione dei brevetti

H. Jenni
Heinz Jenni

BEST AVAILABLE COPY

Patentgesuch Nr. 2002 1344/02

HINTERLEGUNGSBESCHEINIGUNG (Art. 46 Abs. 5 PatV)

Das Eidgenössische Institut für Geistiges Eigentum bescheinigt den Eingang des unten näher bezeichneten schweizerischen Patentgesuches.

Titel:
Vorrichtung und Messverfahren.

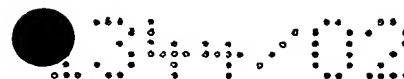
Patentbewerber:
Solvias AG
Klybeckstrasse 191
4057 Basel

Universität Bielefeld
Universitätsstrasse 25
33615 Bielefeld
DE-Deutschland

Vertreter:
Solvias AG Patente, WKL-402.4.26
Klybeckstrasse 191
4002 Basel

Anmeldedatum: 31.07.2002

Voraussichtliche Klassen: G01N



Vorrichtung und Messverfahren

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung mit einer UV-Strahlungsquelle, optischen Elementen zur Führung von UV-Anregungsstrahlung, ein Trennmedium einer Flachbettelektrophorese, auf dem sich ungefärbte, getrennte Flecken elektrophoretisch trennbarer Substanzen befinden, optischen Elementen zur Führung von UV-Fluoreszenzstrahlung, und einem UV-Detektor. Die Vorrichtung wird zur direkten Messung und zum Nachweis elektrophoretisch trennbarer Substanzen mittels natürlicher Fluoreszenzstrahlung im UV-Bereich verwendet.

Zur Trennung elektrisch geladener Moleküle nach Masse und/oder elektrischer Ladung hat sich die Elektrophorese und besonders die Gelelektrophorese seit langem bewährt. Die Methode wird zur qualitativen und quantitativen Analyse von pharmazeutischen Wirkstoffen und Pestiziden sowie deren Metaboliten, zur Trennung und Untersuchung von Aminosäuren, Oligo- und Polypeptiden (Proteine), DNA, RNA, monomeren, oligomeren und polymeren Sachariden, und anderen biologischen Substanzen in Zellen und Körperflüssigkeiten eingesetzt. In letzter Zeit hat besonders die Gelelektrophorese bei der Untersuchung von Zellen (Proteomics) an Bedeutung zugenommen. Neben der Gelelektrophorese in Kolonnen (Tissellusapparatur) für einen präparativen Masstab ist die Kapillargelelektrophorese zur Trennung von Mikromengen und die Flachbettelektrophorese mit verschiedenen flächenförmigen Trennmedien auf anorganischer oder organischer Basis (Silicagele, Metalloxide, Papier, Zellulose, Agarosegele, Dextrangele, Polymergele und besonders Polyacrylamidgele,) in horizontalen oder vertikalen Elektrophoreseapparaturen bekannt. Die elektrophoretische Trennung kann entsprechend verschiedener Trennmechanismen durchgeführt werden, zum Beispiel entsprechend des Verhältnisses von Grösse zu Ladung, der Verschiedenheit der isoelektrischen Punkte (isoelektrische Fokussierung) oder entsprechend der Grösse, wozu Gradientengele oder geladene SDS-Komplexe verwendet werden. Eine Kombination der isoelektrischen Fokussierung und der SDS-PAGE Elektrophorese wird als 2-D Gelelektrophorese bezeichnet, die sich besonders bei Zelluntersuchungen (Proteomics) durchgesetzt hat. Wird die Trennung auf flachen Trägern nur in einer Dimension ausgeführt, spricht man von 1-D Flachbettelektrophorese.

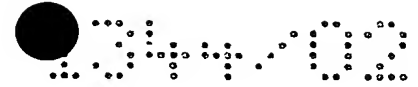
Die Detektion von zu analysierenden Substanzen erfolgt vorteilhaft mit Hilfe spektroskopischer Methoden wie zum Beispiel Absorption oder Fluoreszenz, wobei die Aufnahme des Absorptionsspektrums und das Messen bei charakteristischen Wellenlängen einer Lumineszenzstrahlung üblicherweise in der Kapillarelektrophorese [siehe zum Beispiel U. B. Soetbeer et al. In Journal of Chromatography B, 745 (2000), Seiten 271 bis 278] oder der Flüssigkeitschromatographie (HPLC) angewendet wird. Die in der Kapillargelelektrophorese verwendeten Gele sind flüssig (Austauschgele), und Messungen einer natürlichen Fluoreszenz sind hier wie in der Flüssigkeitschromatographie kein Problem, da bezüglich Absorption und Hintergrundstrahlung der Flüssigkeiten kaum Störungen beobachtet werden.

Bei der 1D- und 2D-Flachbettelektrophorese, bei der feste Trennmedien eingesetzt werden, ist die Bestimmung von nicht sichtbaren Substanzen durch Absorption mit der notwendigen Empfindlichkeit bisher nicht möglich, da der Hintergrund der Trennmedien (Träger und Puffersystem) im niedrigen UV-Bereich (190 bis 280 nm) zu hoch ist. Auch mit sehr dünnen, UV-transparenten Gelen konnte dieses Problem nicht beseitigt werden.

Es werden daher meist substanzspezifische Färbeverfahren verwendet, um nach der Trennung die Bereiche der Substanzen (Spots, Lanes) direkt oder über digitale Abbildungsverfahren auf den Flächen sichtbar zu machen und gegebenenfalls zur Quantifizierung heranzuziehen. Einen Überblick zu den verschiedenen Färbemethoden gibt L. R Williams in „Staining nucleic acids and proteins in electrophoresis gels“, Biotech. Histochem. (2001) 76(3), Seiten 127-132]. Schon vor einer für eine Substanz spezifischen Anfärbung müssen die Proben im allgemeinen mit einem Fixiermittel am Gel fixiert werden, um ein "Ausbluten" während der Anfärbreaktion in den Lösungen zum Anfärben und Entfärben zu vermeiden, was bereits unerwünschte Veränderungen hervorrufen kann.

Bekannte Methoden zum Sichtbarmachen von Proteinen sind das Färben mit Amido black [C. M. Wilson, Anal. Biochem. 6, Seiten 263 bis 278 (1979)] oder mit Comassie Blue Farbstoff [S. Fazekas de St. Groth et al., Biochim. Biophys. Acta 1, Seiten 377-391 (1963)], bei denen aber die geringe Empfindlichkeit als besonderer Nachteil empfunden wird. Ein Vorteil ist aber die quantitative Reaktion der verschiedenen Polypeptide mit Farbstoffen.

Eine in der Proteinanalyse genügend empfindliche Methode ist das Abscheiden und Binden von Silberionen an Proteine [B. R. Oakley et al., Anal. Biochem. 105, Seiten 361-363 (1980)], (Silverstaining), bei der jedoch der geringe dynamische Bereich und Störungen der weiteren



Untersuchungen besonders ins Gewicht fallen. Ein weiterer Nachteil dieser Anfärbemethode ist, dass bei der Färbung eine Diskriminierung zwischen verschiedenen Proteinen erfolgt, also einige Proteine stark und andere Proteine weniger stark anfärben. In unbekannten Proteinproben ist ein Abschätzen der relativen Menge beziehungsweise Häufigkeit der verschiedenen Proteine nicht möglich, was aber im Forschungsgebiet von Zelluntersuchungen (Proteomics) eine der Grundvoraussetzungen ist.

D. Kazmin et al. schlagen in einer neueren Publikation vor [Analytical Biochemistry 301, Seiten 91 bis 96 (2002)], Tryptophan enthaltende Proteine unter UV-Licht mit Trichloressigsäure oder Chloroform zu behandeln, und die Regionen der getrennten Proteine in einem Polyacrylamidgel mittels der angeregten sichtbaren Fluoreszenzstrahlung (natürliche Fluoreszenz des modifizierten Tryptophans) sichtbar zu machen. Ferner wird hier das Spektrum der nativen Fluoreszenz vom UV- in den sichtbaren Bereich verschoben.

Eine weitere bekannte Methode ist das Anfärben mit im sichtbaren Bereich fluoreszierenden Farbstoffen nach der elektrophoretischen Trennung. Ein Vorteil ist die hohe Linearität der Abhängigkeit der gemessenen Intensität von der Menge (dynamischer Bereich). Besonders nachteilig ist aber, dass die Behandlung mit Chemikalien zum Auswaschen niedermolekularer Substanzen führen kann, die nicht erfasst werden. Ferner kann die Veränderung von Substanzen bei der Einwirkung der Chemikalien nicht ausgeschlossen und daher eine quantitative Reaktion aller Substanzen einer Probe nicht gewährleistet werden.

Ähnliche oder gleiche Nachteile bestehen, wenn die Substanzen vor der Trennung mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden, wobei der Farbstoff kovalent gebunden wird. Dies ist ein gängiges Verfahren für die Analyse von Proteinen, da eine hochempfindliche, quantitative Detektion gewährleistet wird. Der grosse Nachteil dieser Technik ist aber, dass die Substanzen in den Analyseproben chemisch verändert werden (auch Masse sowie isoelektrischer Punkt) und nur für spezifische Farbstoffe entwickelte spezielle Systeme zur Detektion verwendet werden können. Das Verfahren ist daher unwirtschaftlich. Ferner kann die Anwesenheit fluoreszierender Farbstoffe weitere Untersuchungen stören, zum Beispiel massenspektrometrische Messungen.

Färbemittel werden im allgemeinen vor einer massenspektrometrischen Messung, vor einer enzymatischen Verdauung oder vor dem Blotten wieder entfernt, was wiederum Veränderungen der getrennten Substanzen verursachen kann. Glykolisierte Proteine sind in diesem

Zusammenhang besonders empfindlich und können oft nicht erfasst werden. Die zusätzlichen Arbeitsschritte sind zudem zeitaufwendig und verursachen Chemikalienabfall, der entsorgt werden muss. Um so bedingte Unsicherheiten bei einer Messung zu umgehen, werden häufig zwei bis 4 Gelplatten, je 2 als Mess- und Referenzplatte verwendet, um aus den Referenzplatten die Substanzen für weitere Messungen zu isolieren. Dieser hohe Materialverbrauch wird als besonderer Nachteil empfunden.

H. Yamamoto et al. beschreiben in Analytical Biochemistry 191, Seiten 58-64 (1990) ein densitometrisches Verfahren zur bildhaften Darstellung nicht markierter, getrennter Substanzen bei der 2-D Gelelektrophorese, bei dem die Absorptionsspektren der Substanzbereiche im UV-Bereich bis in den sichtbaren Bereich durch Selektion geeigneter Wellenlängen aufgenommen werden. Die Methode ist nicht ausreichend empfindlich und eignet sich besonders nicht für die in neuerer Zeit entstandenen Anforderungen an die Untersuchung von Proteinen (Proteomics).

Bislang ist noch kein Verfahren zur direkten Bestimmung von elektrophoretisch trennbaren Substanzen mittels 1D- oder 2D-Flachbettelektrophorese (abgekürzt als PAGE bei Verwendung von Polyacrylamidgelen) ohne Vorbehandlung und Modifikation der Substanzen bekannt geworden, insbesondere bei der Bestimmung und dem Sichtbarmachen von Proteinen in Acrylamidgelen oder anderen Festgelen (die meist quervernetzt sind). Ein solches Verfahren ist äusserst wünschenswert, um die genannten Nachteile, zum Beispiel geringe Empfindlichkeit, Fixieren, Entfärben, Markieren, unterschiedliche Stärke der Färbung für verschiedene Substanzen (Proteine), Verändern der Substanzen (Proteine) durch kovalent gebundenen Farbstoff, zu vermeiden.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass die direkte Messung und/oder bildhafte Darstellung bei der 1D- oder 2D-Flachbettelektrophorese dann möglich ist, wenn man die Eigenfluoreszenz im UV-Bereich von elektrophoretisch trennbaren Substanzen mit UV-Strahlung anregt und misst. Der dynamische Bereich ist unerwartet hoch und es können auch glykolyalisierte Proteine mit der Messung direkt erfasst werden. Ferner ist die Messempfindlichkeit überraschend hoch, so dass sogar ein Nachweis im Bereich von 1 bis 5 Nanogramm pro Bande ermöglicht wird. Die direkte Messung eignet sich daher besonders für die Trennung geringer Substanzmengen, zum Beispiel Zellysate.

Ein erster Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung mit den Komponenten:



- a) einer UV-Quelle (1) für Anregungslicht im Wellenlängenbereich von 140 bis 320 nm;
- b) einem Trennmedium (2) von einer flachbettelektrophoretischen Trennung elektrisch geladener Substanzen;
- c) im Trennmedium (2) verteilten Bereichen von getrennten und nicht markierten Substanzen, die bei Anregung mit besagter UV-Quelle (1) UV-Fluoreszenz im Wellenlängenbereich von 150 bis 400 nm emittieren;
- d) einem UV-Detektor (3) für die UV-Fluoreszenzstrahlung; und
- e) optischen oder optoelektronischen Komponenten für das Filtern, die Führung und/oder Verstärkung der Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung.

Bei der UV-Quelle (1) kann es sich um Laser oder UV-Lampen, zum Beispiel Quecksilberdampflampen oder KrF-Lampen oder Laser zur Mehrphotonenanregung, handeln. Bei der Verwendung von Lampen kann die gewünschte Wellenlänge durch Vorschalten von optischen Filtern, Gittern oder anderen optischen Elementen eingestellt und zur Erzeugung einer ausreichenden Energiedichte mit Linsen fokussiert werden. Bei den Lasern kann es sich um kontinuierliche oder gepulste Laser mit Pulslängen im Bereich von Femto- bis Millisekunden handeln. UV-Laser sind häufig Frequenz vervielfachte Laser, die Strahlung im sichtbaren Bereich generieren. Die Strahlung kann direkt, fokussiert oder als aufgeweiteter Strahl sowie durch Mehrfachbelichtung auf das Gel gerichtet werden. Die Leistungs- und Energiedichte wird so gewählt, dass ein messbares Fluoreszenzsignal erzeugt wird, ohne dabei die Substanzen nennenswert zu schädigen. Die Energiedichte kann zum Beispiel 0,1 bis 3500, bevorzugt 1 bis 500, und besonders bevorzugt 1 bis 50 mJ/cm² in einer Sekunde betragen. Besonders geeignet sind bei der Messung von Proteinen um 35 mW/cm² in einer Sekunde. Solche UV-Lichtquellen sind kommerziell erhältlich. Als besonders geeignet hat sich ein Laser der Firma Spectra Physics (Modell Tsunami) erwiesen, der bei einer Wellenlänge von 280 nm (Frequenz von 840 nm), 80 MHz und 100 Femtosekunden Pulslänge arbeitet, und eine Ausgangsleistung von 150 mW hat.

Die Wellenlänge des UV-Anregungslichts beträgt bevorzugt 140 bis 320 und besonders bevorzugt 220 bis 300 nm.

Das Trennmedium (2) kann aus unterschiedlichen flächenförmigen Materialien bestehen. Sie dürfen im verwendeten Laufmittel nicht löslich und sie müssen dielektrisch sein. Es kann sich um anorganische Materialien handeln, zum Beispiel Metalloxide und Salze wie Silikate. Einige Beispiele sind Aluminiumoxid, Titanoxid, Silicagele und Kieselgur. Weitere geeignete

Materialien sind Papiere und Cellulose. Besonders geeignete Materialien sind gegebenenfalls vernetzte, gelbildende Polymere, wie zum Beispiel Polyacrylamidgele, Agarosegele und Dextrangele.

Das Trennmedium kann zur Messung auf einem dielektrischen oder elektrisch leitenden Träger aufgebracht sein, zum Glas, Quarz oder Kunststoffen, Metalloxiden und Metallen. Besonders geeignet sind hierfür Materialien, die UV-Strahlung reflektieren, zum Beispiel polierte Metallplatten oder mit Metallen beschichtete Kunststoffplatten.

Trennmedien für die elektrophoretische Trennung sind vielfach bekannt, in der Literatur beschrieben und kommerziell erhältlich. Sie werden daher hier nicht näher beschrieben. Es sei aber erwähnt, dass für das wichtige Gebiet der Trennung von Proteinen hauptsächlich Gele auf Basis von Polyacrylamiden eingesetzt werden. Die Trennmedien weisen vorteilhaft eine geringe UV-Absorption und UV-Fluoreszenz auf, um eine hohe Messempfindlichkeit erzielen zu können.

Die Trennmedien können zur Erzielung möglichst planer Oberflächen und zum Schutz vor Austrocknung und Alterung mit einer Abdeckung versehen werden, die sowohl für das Anregungslicht als auch das Fluoreszenzlicht optisch transparent ist, da die Bestrahlung auf das Gel gerichtet wird und die Messung der Fluoreszenzstrahlung vorteilhaft durch die Abdeckung vorgenommen wird. Für UV-Strahlung durchlässige Materialien sind bekannt. Es kann sich um Kunststoffe handeln, die zweckmässig als Folien ausgebildet sind. Sehr gut eignet sich auch Quarzglas.

Die Substanzen können im Gel in ein- oder zweidimensionaler Richtung verteilt sein. Die Substanzen sind nicht chemisch für eine Detektion modifiziert. Sie müssen zur Emission von UV-Licht anregbar sein. Solche Substanzen enthalten zum Beispiel aromatische oder heteroaromatische Reste und/oder gegebenenfalls konjugierte ungesättigte Kohlenstoff- oder Kohlenstoff-Heteroatom-Doppelbindungen oder Stickstoffmehrfachbindungen. Die Heteroatome können ausgewählt sein aus der Gruppe O, N, S und P. Ferner enthalten die Substanzen elektrisch geladene Gruppen, zum Beispiel saure Gruppen (zum Beispiel Carboxyl-, Phosphor- oder Phosphonsäure-, Bor- oder Boronsäure-, und/oder Schwefel- oder Sulfonsäuregruppen) und/oder basische Oniumgruppen (zum Beispiel Ammoniumgruppen).

Die Wellenlänge der Fluoreszenzstrahlung beträgt bevorzugt von 150 bis 400 und besonders bevorzugt von 230 bis 400 nm.

Das Messprinzip wird mit Proteinen als Substanz erläutert. Proteine können die Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und/oder Tyrosin enthalten, bei denen das Emissionsmaximum bei Wellenlängen von 282 nm, 303 nm, beziehungsweise 348 nm liegt. Der Extinktionskoeffizient ist im Wellenlängenbereich von 200 bis 320 nm hoch und Proteine eignen sich daher besonders für das erfindungsgemässe Messprinzip. Viele organische Substanzen mit den zuvor erwähnten Strukturelementen weisen ähnliche Eigenschaften auf und sind einer Messung mit der erfindungsgemässen Vorrichtung zugänglich, wie zum Beispiel auch Genmaterial (DNA oder RNA), die elektrophoretisch trennbar sind.

Bei dem UV-Detektor (3) kann es sich um Photodetektoren zur Messung der Fluoreszenzintensität handeln, die vielfach kommerziell erhältlich sind. Geeignete Detektoren sind zum Beispiel Photomultiplier, Photodioden (Halbleiterdioden oder Halbleiterdiodenanordnungen beziehungsweise -arrays) und UV-empfindliche CCD-Kameras. CCD-Kameras (elektronische Kameras mit digitaler Bildaufzeichnung und Wiedergabe) sind bevorzugt. UV-empfindliche CCD-Kameras werden zum Beispiel von der Firma Andor (USA) angeboten.

Bei der Komponente (d) kann es sich um optische Filter zur Ausblendung unerwünschter Hintergrund- und/oder Streustrahlung handeln, die im Strahlengang zwischen der Platte (3) und dem UV-Detektor angeordnet werden. Optische Filter können auch verwendet werden, um die Wellenlänge des Anregungslichts einzustellen und von der UV-Lichtquelle ausgehende unerwünschte Strahlung auszublenden. Bei den Komponenten kann es auch um Spiegel, Prismen oder diffraktive Elemente zur Ablenkung oder dem Sammeln von Anregungslicht handeln. Ferner sind Linsen- oder Linsensysteme zweckmässig, mit denen Strahlung geführt oder fokussiert wird. Sphärische Linsen können zur Aufweitung eines Laserstrahles eingesetzt werden. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit können auch Lichtverstärker (Restlichtverstärker) eingesetzt werden. Zwischen UV-Lichtquelle und der Platte (3) können auch Abblendelemente angeordnet sein, die eine Bestrahlung in definierten Zeitintervallen erlauben.

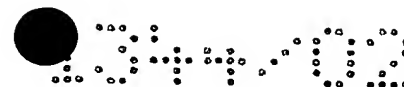
Figur 1 zeigt eine Ausführungsform einer erfindungsgemässen Vorrichtung. Der Laserstrahl (4) eines UV-Lasers (1) wird durch eine Konvexlinse (5) aufgeweitet und auf eine Abdeckung (6) des Trennmediums (2) gerichtet. Die Abdeckung schützt eine Schicht Acrylamid-

gel (7), die auf einer rostfreien und polierten Stahlplatte (8) aufgebracht ist. Im Acrylamidgel befinden sich über die Fläche verteilte Bereiche getrennter Substanzen, die bei Bestrahlung UV-Fluoreszenz (9) erzeugen. Die Fluoreszenzstrahlung (9) wird über sphärische Linsen (10) und (11), zwischen denen ein Bandpassfilter (12) zum Beispiel für den Wellenlängenbereich 300-375 nm angeordnet ist, zu einem UV-Detektor (3) geführt, zum Beispiel einer UV-empfindlichen CCD Kamera.

Die erfindungsgemäße Anordnung eignet sich hervorragend zur direkten Messung von Substanzen im Gel einer Platte für die 1D- oder 2D-Gelelektrophorese, ohne dass die Substanzen vor oder nach der Trennung markiert werden müssen. Die Methode bietet gegenüber benutzten Standardverfahren erhebliche Vorteile:

- a) die Verwendung von Chemikalien zur Messung/Sichtbarmachung wird vollständig vermieden;
- b) der Zeitaufwand für die Messung wird erheblich reduziert;
- c) die Veränderung von Substanzen durch die Modifikation mit Chemikalien und ein Auswaschen von Substanzen durch das Modifikationsverfahren wird vollständig vermieden;
- d) die chemische Nachbehandlung für weitere Untersuchungen, zum Beispiel mittels Massenspektroskopie, wird vermieden;
- e) Vermeidung einer präparativen Trennung gegenüber Standardverfahren, bei denen eine analytische und parallel eine präparative Trennung durchgeführt werden, um unmodifizierte Substanzen für weitere Untersuchungen bereitzustellen;
- f) Erfassung aller Substanzen einer zu trennenden Mischung, bei Proteinmischungen zum Beispiel auch Glykoproteine;
- g) sehr hohe Empfindlichkeit, vergleichbar mit der Silbermarkierung, und zusätzlich ein hoher dynamischer Bereich wie beim Markieren mit Farbstoffen und Fluorophoren;
- h) Messung von nicht mit Farbstoffen/Fluorophoren modifizierbaren Substanzen;
- i) keine signifikante Zersetzung von Proteinen durch UV-Bestrahlung bis mindestens 35 mJ/cm^2 , was mittels Massenspektroskopie von bekannten Proteinen nachweisbar ist;
- j) keine zusätzliche Verwendung von Trennmedien als Referenzmaterial.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung von mittels 1D- oder 2D-Flachbettelektrophorese getrennten Substanzen, bei dem getrennte Substanzen im Trennmedium für elektrophoretische Trennungen mit einer Lichtquelle bestrahlt werden, und emittiertes Fluoreszenzlicht mit einem Detektor gemessen wird, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man (a) bei Einwirkung von UV-Licht im UV-Bereich Fluoreszenz emittierende



Substanzen (b) im Trennmedium direkt mit UV-Licht einer Wellenlänge von 140 bis 320 nm bestrahlt und (c) die UV-Fluoreszenz bei Wellenlängen von 150 bis 400 nm mit einem UV-empfindlichen Detektor misst.

Für das Verfahren gelten die zuvor für die Vorrichtung beschriebenen Ausführungsformen und Bevorzugungen.

Die Erzeugung des digitalen Bildes von der Probe kann auf verschiedenen Arten erfolgen:

- 1) Die gesamte Fläche wird gleichzeitig zur Fluoreszenz angeregt und eine digitale Kamera nimmt ein Bild vom gesamten Trennmedium auf.
- 2) Die Probe wird Abschnittsweise vermessen und die einzelnen Elemente werden im Computer zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Dabei kann ein Abschnitt beliebig klein sein (begrenzt durch den Laserfokus von ca. 200 nm) oder beliebig groß (wie 1). Ein Abschnitt kann wieder ein Bild sein (z.B. mehrere Spots enthalten) oder nur ein Punkt des späteren Bildes (Prinzip des Scanners). Je kleiner der Abschnitt gewählt wird desto effektiver lässt sich das Fluoreszenzlicht sammeln. Erhöhte Sammeleffizienz verkürzt die Messzeit, verringert potentielle UV-Schäden an den gemessenen Substanzen und verbessert die Empfindlichkeit der Aparatur. Um die gesamte Probe nach den Scannerprinzip zu vermessen kann die a) Probe selbst bewegt werden, b) der Detektor bewegt werden, c) die Anregungsquelle bewegt werden, d) das Anregungs- und Emissionslicht umgelenkt werden, oder Kombinationen von a) - d) verwendet werden. Wird nur ein Punkt oder eine Linie angeregt, kann durch konfokale Detektion die Untergrundfluoreszenz (z.B. der Abdeckung und/oder Probenhalterung) stark reduziert werden.

Die Probe oder Abschnitte der Probe können mehrfach vermessen werden, um eine bessere Nachweisgrenze zu erhalten.

Für das erfindungsgemässe Verfahren werden vorteilhaft UV-Laser verwendet, die über das Prinzip einer Frequenzvervielfachung für verschiedene Wellenlängen kommerziell erhältlich sind. Es kann sich um kontinuierliche oder gepulste Laser handeln. Gepulste Laser sind besonders geeignet, wobei Laser mit unterschiedlichen Pulslängen bekannt sind, die im Bereich von Mikro- bis Femtosekunden liegen können. Kurze Pulslängen im Femtosekundenbereich sind besonders vorteilhaft, da die angeregte Fluoreszenzstrahlung eine Lebensdauer hat, die im wesentlichen zwischen den einzelnen Pulsen liegt, so dass nur wenig oder



keine Anregungsstrahlung auf den UV-Detektor fällt. Die Anregungsstrahlung wird vorteilhaft in einem Winkel von kleiner als 90° zur Senkrechten der Platte (3) eingestrahlt.

Die Messung kann in verschiedenen Varianten vorgenommen werden. Grundsätzlich kann das Anregungslicht so aufgeweitet werden, dass das gesamte Trennmedium belichtet wird, was zum Beispiel nicht zu grosser Kantenlänge möglich ist. Die Platte kann einmal oder mehrmals belichtet werden, um eine ausreichende Fluoreszenzstrahlung für die Messung zu erzielen.

Das Verfahren ist sehr variabel. Insbesondere können die Bedingungen so eingestellt werden, dass photoempfindliche Substanzen geschont und eine Zersetzung weitgehend unterdrückt werden kann. Das Verfahren eignet sich auch für eine Automatisierung, was für eine industrielle Anwendung besonders wertvoll ist.

Wenn als UV-Detektor ein UV-Spektrometer verwendet wird, können die Substanzbereiche auch spektrometrisch zum Beispiel über einen Wellenlängenbereich von 180 bis 400 nm bestimmt werden. Auf diesem Wege können auch spezifische Substanzen an Hand charakteristischer Wellenlängen der Fluoreszenzstrahlung direkt auf dem Trennmedium, oder nach Bestimmung der getrennten Substanzbereiche mit UV-Detektoren, identifiziert werden.

Für die Entnahme der Substanzbereiche zu weiteren Untersuchungen muss beachtet werden, dass die Substanzen farblos, daher unsichtbar, und mit blossen Auge nicht erkennbar sind. Eine Möglichkeit zur Entnahme besteht in der Herstellung eines transparenten Negativfilmes auf zum Beispiel Kunststoffolien, den man zur Indizierung der Substanzbereiche auf der Oberfläche des Gels auflegen kann. Eine andere Möglichkeit besteht in der automatisierten Entnahme über ein geeignetes Rechenprogramm, das digitale Aufzeichnungen auswertet und eine mechanische Vorrichtung zur Probenentnahme steuert.

Das erfindungsgemässe Verfahren kann in allen Bereichen angewendet werden, in denen Trennungen und Untersuchungen von Substanzen mittels Gelelektrophorese vorgenommen werden. Ein wichtiger Bereich ist die biochemische Forschung zur Untersuchung von Körperflüssigkeiten, oder entsprechenden Extrakten und Konzentraten. Die Untersuchung von Proteinen spielt hier eine besonders grosse Rolle (Proteomics). Das Verfahren kann für diagnostische Untersuchungen eingesetzt werden, bei denen das Vorhandensein von spezifischen Substanzen auf bestimmte Krankheiten schliessen lässt. Ferner kann die Verteilung

und der Abbau (Metabolismus) von pharmazeutischen Wirkstoffen und Pestiziden in Körperflüssigkeiten von Pflanzen und Tieren einschliesslich Warmblütern mit dem erfindungsgemässen Verfahren untersucht werden. Das Verfahren kann auch zur Qualitätskontrolle von Wirkstoffen dienen, und zur Qualitätskontrolle von Western-Blots vor der Zugabe von Antikörpern eingesetzt werden. Das Verfahren ist sehr empfindlich und erlaubt die Messung von Mengen selbst bis zu 1 bis 5 Nanogramm. Es ist daher besonders für die Untersuchung kleinster Substanzmengen geeignet.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

Beispiel 1: Trennung der Proteine eines Zellextraktes.

Der experimentelle Aufbau entspricht dem in Figur 1 dargestellten Aufbau. Als UV-Lichtquelle wird ein UV-Laser der Firma Spectra Physics verwendet (Tsunami®, 840 nm, 80 MHz, 100 fs Pulslänge, Frequenzverdreifung zu 280 nm Anregungslicht, Ausgangsleistung 150 mW). Zwischen Konvexlinse (5) und dem Trennmedium (2) befindet sich eine Blende, mit der eine quadratische Bestrahlungsfläche von 1 cm Kantenlänge eingestellt wird. Die Energiedichte an der Oberfläche des Trennmediums (2) beträgt 40 mW/cm². Die Belichtungszeit beträgt 1 Sekunde. Als UV-Detektor wird eine käufliche UV-sensitive BCCD Kamera der Firma LaVision Biotec Deutschland (QE>65%) eingesetzt. Die 1 cm² grosse Fläche wird über 2 UV-Linsen der Firma Nikon (105 mm, f = 4,5) abgebildet und im Computer zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Zwischen den beiden Linsen befindet sich ein UV-Bandpassfilter für den Wellenlängenbereich von 300 bis 375 nm. Für das gewählte Format von 8 x 7 cm (Mini-Gel, nach Aufquellen in dreifach destilliertem Wasser etwa 20% größer als bei der Trennung) werden insgesamt 56 Bilder aufgenommen. Hierzu wird das Trennmedium manuell in einem Raster mit Abstand 1 cm in einem Positionierungstisch bewegt.

Das Trennmedium (2) ist als 1 mm dicke Schicht eines käuflichen Polyacrylamidgels auf einer rostfreien Stahlplatte (8) aufgebracht, Das Polyacrylamidgel ist mit einer 1 mm dicken Quarzplatte (6) abgedeckt.

Die Trennung mittels 2-D Gelelektrophorese wird nach Klose, J. *Methods Mol Biol* 1999, 112, 147-172 als Kombination von isoelektrischer Fokussierung (IEF) mit Trägerampholyten (erste Dimension) und SDS-PAGE (zweite Dimension) durchgeführt.

Die IEF wird in gelgefüllten Glasstangen durchgeführt (Durchmesser 0,9 mm, 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 3,5% Acrylamid, 0,3% Piperazindiacrylamide und eine Gesamtmenge von 4% Trägerampholyt pH 2-11). Die Proteine stammen von Zelllysaten der Zellen EA.hy 926 [Edgell, C. J. S. Proc Natl Acad Sci USA 1983, 80, 3734-3737]. Es werden etwa 10 µg Protein an der anodischen Seite der IEF Gele von 7 Zentimeter Länge aufgebracht und unter Bedingungen einer nicht im Gleichgewicht pH Gradient Elektrophorese (non equilibrium pH gradient electrophoresis; NEPHGE) für Vh 1842 fokussiert. SDS-PAGE wird in 15% Acrylamid Gel mit den IEF Gelen als Stapelgel durchgeführt. Die Gelgröße beträgt 70x60x1 Millimeter.

Nach der Trennung werden die Proteine über Nacht im Gel fixiert (10% Essigsäure, 50% Ethylalkohol und 40% dreifach destilliertes Wasser). Vor der Messung wird ein Gel für 45 min in 50ml dreifach destilliertem Wasser gewaschen (zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz), auf die Stahlplatte gelegt und mit einem Quarzglasplatte abgedeckt.

Mit der Kamera wird ein Bild der UV-Floureszenz aufgenommen; dunkle Spots entstehen durch Fehlfarbandarstellung in der Bildverarbeitung. Die Darstellung dient dem besseren Vergleich mit der Standardmethode „Silberfärbung“, bei der die getrennten Proteine als schwarze Flecken dargestellt werden. Das erhaltene Bild ist vergleichbar mit einer mittels Silberionen sichtbar gemachten Trennung.

Beispiel 2: Bestimmung der Empfindlichkeit

Es wird die Anordnung gemäss Beispiel 1 verwendet. Es werden 1D-Gelplatten von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland, NOVEX 12 % Tris-Glycin Gel 12 oder 10 well 1mm Dicke Nr. EC60052 bzw. EC6005) (mit Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts beladen und getrennt (Lysozyme, (14,6 kDa, Huhn), Rinder Anhydrase (29 kDa), GAPDH (Kaninchen, 36 kDa), BSA (Rinder, 66 kDa) und Phosphorylase (Kaninchen, 97,4 kDa). Die Proteine werden in gleichen Mengen gemischt und in SDS Puffer (NOVEX Tris-Glycine SDS denaturierender Proben Puffer LC2676) so verdünnt, dass nach Auftragen auf das Gel 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 und 1 ng je Bande (je Protein) vorliegen. Die Trennung erfolgt nach [Laemmli U.K., 1970, Nature 227:680-685] Laufmittel Puffer: NOVEX Tris-Glycine SDS Running Buffer LC2675), Einwandern der Probe bei konstant 50 V für 10 Minuten, anschließend so lange (etwa 1,5 Stunden) laufen lassen (bei konst 145 V), bis die Lauffront (Bromphenolblau, im Proben Puffer enthalten) das untere Ende der Gele erreicht hat.

Nach der Trennung werden die Proteine im Gel wie in Beispiel 1 fixiert und vor der Messung wird ein Gel für 45 Minuten in 50ml dreifach destilliertem Wasser gewaschen, auf die Stahlplatte gelegt und mit einer Quarzglasplatte abgedeckt.

Nach der Trennung werden die getrennten Bereiche gemäss der Durchführung in Beispiel 1, sowie nach den Verfahren der Silbermarkierung und Anfärbung mit Comassie Blue sichtbar gemacht und verglichen. Die Empfindlichkeit gemäss Durchführung nach Beispiel 1 liegt bei 1 bis 5 ng Nachweisgrenze, vergleichbar mit dem Verfahren der Silbermarkierung. Bei dem Verfahren mit Comassie Blue liegt die Nachweisgrenze bei 10 bis 50 ng.

Patentansprüche:

1. Vorrichtung mit den Komponenten:

- a) einer UV-Quelle (1) für Anregungslicht im Wellenlängenbereich von 140 bis 320 nm;
- b) einem Trennmedium (2) von einer flachbettelektrophoretischen Trennung elektrisch geladener Substanzen;
- c) im Trennmedium (2) verteilten Bereichen von getrennten und nicht markierten Substanzen, die bei Anregung mit besagter UV-Quelle (1) UV-Fluoreszenz im Wellenlängenbereich von 150 bis 400 nm emittieren;
- d) einem UV-Detektor (3) für die UV-Fluoreszenzstrahlung; und
- e) optischen oder optoelektronischen Komponenten zum Filtern, Führen und/oder Verstärken der Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung.

2. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der UV-Quelle um einen Laser, UV-Lampen oder Laser zur Mehrphotonenanregung.

3. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die UV-Quelle eine Energiedichte von 0,1 bis 3500 mJ pro cm² aufweist, gemessen an der Oberfläche des Trennmediums.

4. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Wellenlänge des Anregungslichts 140 bis 320 nm beträgt.

5. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Trennmedium um Metalloxide, Salze, Papiere, Cellulose oder vernetzte, gelbildende Polymere handelt.

6. Vorrichtung gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den gelbildenden Polymeren um Polyacrylamide, Agarose oder Dextran handelt.

7. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Trennmedium auf einem Träger aufgebracht und gegebenenfalls mit einer UV-durchlässigen Abdeckung versehen ist.

8. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen der Komponente c) aromatische oder heteroaromatische Reste und/oder gegebenenfalls konjugierte ungesättigte Kohlenstoff- und/oder Kohlenstoff-Heteroatom-Doppelbindungen und/oder Stickstoffmehrfachbindungen und elektrisch geladene Gruppen enthalten.

9. Vorrichtung gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Substanzen um Proteine handelt.

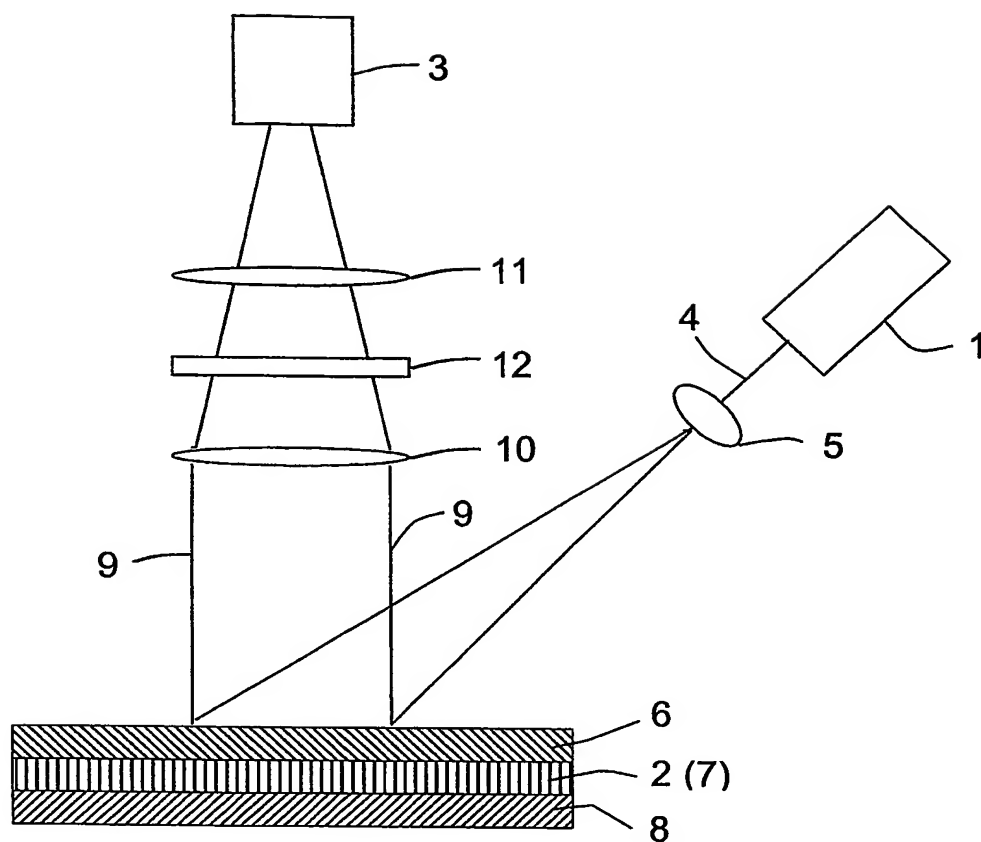
10. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die UV-Fluoreszenz 150 bis 400 nm beträgt.

11. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem UV-Detektor um eine CCD Kamera, einen Photomultiplier, eine Halbleiterdiode oder eine Halbleiterdiodenanordnung handelt.

12. Verfahren zur Bestimmung von mittels 1D- oder 2D-Flachbettelektrophorese getrennten Substanzen, bei dem getrennte Substanzen im Trennmedium für elektrophoretische Trennungen mit einer Lichtquelle bestrahlt werden, und emittiertes Fluoreszenzlicht mit einem Detektor gemessen wird, dadurch gekennzeichnet, dass man (a) bei Einwirkung von UV-Licht im UV-Bereich Fluoreszenz emittierende Substanzen (b) im Trennmedium direkt mit UV-Licht einer Wellenlänge von 150 bis 320 nm bestrahlt und (c) die UV-Fluoreszenz bei Wellenlängen von 150 bis 400 nm mit einem UV-empfindlichen Detektor misst.

Zusammenfassung

Mittels 1D- oder 2D-Flachbettelektrophorese getrennte Substanzen können direkt und ohne vorherige Markierung bestimmt werden, wenn man deren Eigenfluoreszenz im UV-Bereich mit einem UV-Detektor misst, die durch Bestrahlung mit UV-Licht im Wellenlängenbereich 140 bis 320 nm angeregt wird.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.